



<p>(51) 国際特許分類 G01N 33/533, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/47968</p> <p>(43) 国際公開日 1997年12月18日(18.12.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01960</p> <p>(22) 国際出願日 1997年6月9日(09.06.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/170637 1996年6月10日(10.06.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所 (LABORATORY OF MOLECULAR BIOPHOTONICS)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 Shizuoka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 細井 茂(HOSOI, Shigeru)[JP/JP] 門内幸子(KADOUCHI, Sachiko)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所内 Shizuoka, (JP) 小嶋牧子(KOJIMA, Makiko)[JP/JP] 〒390 長野県松本市島内3430-1-G101 Nagano, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, RU, UA, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: HIGHLY SENSITIVE FLUORESCENT IMMUNOASSAY</p> <p>(54)発明の名称 高感度蛍光イムノアッセイ</p> <p>(57) Abstract A fluorescent immunoassay characterized by labeling a sample with a fluorescent marker having a nucleic acid moiety stained with such a sufficient number of fluorochromes as to enable the measurement of fluorescent spots and a reactive group capable of binding specifically to the sample, immobilizing the sample thus labeled onto a solid phase, and then counting the fluorescent spots. The nucleic acid moiety of the fluorescent marker is a double- or single-stranded nucleic acid. Staining with the fluorochromes is effected with the use of intercalater type fluorochrome(s), mirror group type fluorochrome(s), and fluorochrome(s) covalently bonded to the nucleic acid.</p> <div data-bbox="755 1228 1380 1438"> <p>2本鎖核酸、インターカレーター型蛍光色素(☆)</p> <p>特異的結合反応性基</p> </div> <p>a ... reactive group capable of specifical binding</p> <p>b ... double-stranded nucleic acid</p> <p>c ... intercalater type fluorochrome</p>		

(57) 要約

本発明は、蛍光輝点として測定可能なように十分な数の蛍光色素により染色した核酸部分と、被検体に特異的に結合する特異的結合反応基とを有する標識蛍光物質を用いて前記被検体を標識し、前記標識された被検体を固相上に固定し、蛍光輝点数を計数することを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供するものである。係る標識蛍光物質の核酸部分は、2本鎖核酸又は1本鎖であり、かつ前記蛍光色素による染色は、インターカレーター型蛍光色素、マイナーグループ型蛍光色素、核酸に共有結合した蛍光色素によるものである。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴス ラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ			TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

明細書

高感度蛍光イムノアッセイ

技術分野

本発明は、高感度蛍光イムノアッセイに関する。

背景技術

生体内微量成分を高感度でしかも特異的に検出する方法がいくつか知られている。一般的には目的の微量の被検体を適当な標識用物質でラベル化し、この目的被検体を特異的結合反応に基づき適当な媒体に固定化し、十分洗浄した後に該標識用物質を適当な手段で検出することにより目的の微量被検体を検出又は定量するものである。ここで一般的に用いられる上記特異的結合反応としては、抗原抗体反応、アビジン・ビオチン結合反応、レセプター・リガンド結合反応等である。

また、上記標識用物質及びその検出する方法は、標識用物質の化学的、物理的性質により種々知られている。通常は、(1)適当な固定相上に固定された上記の標識物質でラベル化された微量被検体からの信号、例えば放射線量、蛍光量、発光量（化学発光、生物発光）の総和を計測し、得られる測定値と微量被検体の濃度との相関関係に基づいて被検体の存在の判定及びその定量をする。一方(2)適当な固定相上に固定された上記の標識物質でラベル化された微量被検体の数を、その標識物質からの放射線、蛍光、発光（化学発光、生物発光）等の現象を観測することで計測し、その数に基づき、被検体の存在の判定及びその定量する方法が考えられる。すなわち、上記(2)の方法によれば、固相上で固定され、標識物質でラベル化された被検体の1個1個を計数可能なことが必要である。また、上記(2)による方法は、上記(1)による方法に比較して、バックグラウンドノイズの減少、測定時間の短縮、測定誤差の減少（測定感度の向上）等の有利な点が考

えられる。

従って、適当な固定相上に固定された標識物質でラベル化された微量被検体の 1 個 1 個を、その標識物質からの信号の有無に基づき計測し、その数により、被検体の存在の判定及びその定量をする方法の開発が望まれる。

通常知られている標識用蛍光分子による被検体の標識法は、理想的な条件では一分子検出が可能なはずではあるが、通常の蛍光顕微鏡等の使用による実際の測定条件下では係る超高感度検出に用いることは難しい。放出される蛍光量が蛍光色素の退色により極めて少なく、つまり標識された被検体からの信号が極めて小さく弱いのでバックグラウンドの蛍光等の問題もあり、1 個 1 個の発光現象を計測することは實際上極めて難しいという問題点がある。

発明の開示

本発明に係る高感度蛍光イムノアッセイは、上記の問題点を解決し、蛍光標識された被検体を高感度で検出可能とする目的を達成するものであり、蛍光色素により染色した核酸部分と、被検体に特異的に結合する特異的結合反応基とを有する標識蛍光物質を用いて前記被検体を標識する工程と、前記標識蛍光物質の蛍光を検出する工程を有することを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とするものである。

さらに本発明は、前記標識された被検体を固相上に固定する工程をさらに含むことを特徴とする前記記載の蛍光イムノアッセイを提供することを目的とするものである。

さらに、本発明は、前記蛍光を検出する工程が、さらに光学的拡大手段を用いることを特徴とする前記記載の蛍光イムノアッセイを提供することを目的とするものである。

さらに、本発明は、前記光学的拡大手段が蛍光顕微鏡であることを特徴とする前記記載の蛍光イムノアッセイを提供することを目的とするものである。

さらに、本発明は、前記標識蛍光物質の蛍光を、蛍光輝点数として計数することを特徴とする前記記載の蛍光イムノアッセイを提供することを目的とするものである。

さらに、本発明は、蛍光色素により染色した核酸部分と、被検体に特異的に結合する特異的結合反応基とを有する標識蛍光物質を用いて前記被検体を標識する工程と、前記標識蛍光物質の蛍光を検出する工程を有することを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

さらに、本発明は、前記標識された被検体を固相上に固定する工程をさらに含むことを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

また、本発明は、前記蛍光を検出する工程が、さらに光学的拡大手段を用いることを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

また、本発明は、前記光学的拡大手段が蛍光顕微鏡であることを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

さらに、本発明は、前記標識蛍光物質の蛍光を、蛍光輝点数として計数することを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

さらに、本発明は、前記核酸部分が塩基数100～50000を有する2本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が、前記塩基数に対し10～25%の数のインターカレーター型蛍光色素によることを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

また、本発明は、前記核酸部分が塩基数1000～5000を有する2本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が、100～1200の数のインターカレーター型蛍光色素によることを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

さらに、本発明は、前記核酸部分が塩基数100～50000を有する2本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が、前記塩基数に対し10～25%の数のマイナーグループ型蛍光色素によることを特徴とする蛍光イムノアッセイを

提供することを目的とする。

また、本発明は、前記核酸部分が塩基数100～50000を有する1本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が、前記塩基数に対し10～70%の数の蛍光色素を前記核酸に共有結合したことを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

また、本発明は、前記核酸部分が塩基数100～50000を有する2本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が前記塩基数に対し10～70%の数の蛍光色素の前記2本鎖核酸に共有結合したものであることを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

さらに、本発明は、前記特異的結合反応基が、前記核酸の末端部に結合したビオチンであることを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

また、本発明は、前記蛍光顕微鏡の倍率が対物レンズ20～100倍であることを特徴とする蛍光イムノアッセイを提供することを目的とする。

図面の簡単な説明

図1Aは、本発明に係る蛍光色素標識核酸の1例を示す図であり、インターカラー型蛍光色素で染色された2本鎖核酸からなる標識体を示すものである。

図1Bは、本発明に係る蛍光色素標識核酸の1例を示す図であり、ヌクレオチドに共有結合した蛍光色素を含有した1本鎖核酸からなる標識体を示すものである。

図1Cは、本発明に係る蛍光色素標識核酸の1例を示す図であり、ヌクレオチドに共有結合した蛍光色素を含有した2本鎖核酸からなる標識体を示すものである。

図1Dは、本発明に係る蛍光色素標識核酸の1例を示す図であり、ヌクレオチドに共有結合した蛍光色素を含有した1本鎖核酸からなる標識体を示すものである。

図2は、蛍光染色された標識核酸の観察方法を示し、マイクロタイタープレートの内面を下から倒立型落射蛍光顕微鏡で観察する方法を示す図である。

図3は、本発明に係る方法の一実施例を示すものであり、固相表面にビオチンを

共有結合した後洗浄し、さらに固相表面のビオチンにアビジンを固定した後洗浄し、さらにアビジンに染色核酸を固定した後洗浄して蛍光計測する手順を示す。

図4は、蛍光染色された核酸の蛍光顕微鏡イメージを示し、ラムダファージのDNA（長さ48.5kbp、16 μ m）を示す図である。

図5は、ビオチン固定化の際のNHSビオチンの濃度に応じた標識核酸の蛍光強度変化を示す図である（ここでそれぞれ、○は100塩基長、□は500塩基長、◇は3000塩基長を示す）。

図6は、蛍光色素ラベル化オリゴヌクレオチドを用いてPCR増幅した入DNAの一部を示す蛍光顕微鏡写真である。

図7Aは、PGE2-BSAの濃度を0.84mg/mlとした場合の蛍光顕微鏡写真を示す。

図7Bは、PGE2-BSAの濃度を0.164mg/mlとした場合の蛍光顕微鏡写真を示す。

図7Cは、PGE2-BSAの濃度を0.0mg/mlとした場合の蛍光顕微鏡写真を示す。

図8は、図7A～Cの画像処理から得られた、蛍光輝点数をPGE2-BSA濃度に対するプロットを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明に係る高感度蛍光検出用標識体

本発明に係る高感度蛍光検出用標識体は、一般に、図1A～図1Dに模式的に示すように、(1)蛍光色素により標識された2重鎖または1重鎖の核酸であり、かつ、固定相に固定された被検体を、通常の蛍光顕微鏡下で1個1個数えられるほどの大きさの輝点を与えるものであり、さらに(2)標識用の特異的結合反応基を有するものである。係る大きさの蛍光輝点を与えるために、本発明に係る高感度蛍光検出用標識体はその標識分子中に十分な数の蛍光色素を有する大きさの分子である。

(2本鎖核酸インターカレーター型蛍光色素)

本発明に係る標識体の好ましい一形態は、図1Aで示されるように、適当な塩

基配列数の2本鎖核酸であって、かつインターカレーター型蛍光色素で染色され、さらに特異的結合反応性基を有するものである。係る2重鎖核酸は十分な塩基数を有し、望ましい数のインターカレーター型蛍光色素で染色されたものであり、特異的結合反応性基を介して標識された被検体は、十分な蛍光を発生し、蛍光顕微鏡下で1個ずつ観測可能な蛍光輝点を与えるものである。この場合上記2重鎖核酸の塩基数、塩基の種類には、特に制限はないが、好ましくは100～50000個（さらに好ましくは、100～5000個）の塩基対からなる核酸である。係る範囲の塩基数よりも少ない場合には、十分な数のインターカレーター型蛍光色素で染色することができず、従って、通常の倍率（対物レンズ20～100倍）の蛍光顕微鏡下で1個ずつ観測可能なほど十分な大きさの蛍光輝点を与えることができない。また、係る範囲の塩基数よりも多い場合には、該核酸自体の安定性が十分でなく、自己分解等の問題が生じ、取扱及び保存安定性が悪くなる。通常の核酸（DNA）の場合、インターカレーター型蛍光色素を用いる場合には、約核酸塩基数の約25%程度の色素が取り込まれ得るものである。例えば、4000塩基長の核酸であれば、通常200～1000個程度の色素で染色されることとなる。この多量の蛍光色素による標識が、通常の蛍光顕微鏡でも十分1個ずつ認識可能とするものである。

また、必要な長さの2本鎖核酸を調製するためには種々の公知の方法が使用可能である。例えば、化学合成に基づくもの、酵素反応に基づくもの、天然の核酸から調整する場合、もしくはPCR等により調整する方法、またはプラスミドやファージのクローニング法による場合等が好ましく使用可能である。

本発明において好ましい調製方法としては、さらに以下に説明するように、特異的結合反応性を有する基を有する必要があること、および十分な長さの核酸を効率的に調整することを同時に満たすものとしてポリメラーゼチェーン反応（PCR法）を用いることが好ましい。実施例に示したように、この方法を使用すると、1本の核酸の末端にビオチンを結合した、約3000塩基対を有するブロー

ブを調整することが可能となる。

本発明に係る 2 本鎖プローブは、構成する核酸の種類には特に制限はない。従って、必要な長さの 2 本鎖核酸を得るためには種々の公知の方法が使用可能である。例えば、化学合成に基づくもの、酵素反応に基づくもの、天然の核酸から調整する場合、もしくは P C R 等により調整する方法、またはプラスミドやファージのクローニング法により調整することができる。

本発明においては、以下に説明するように、さらに特異的結合反応性を有する基を結合する必要があること、および十分な長さの核酸を効率的に調整することを同時に満たすものとして P C R 法を用いることが好ましい。実施例に示したように、この方法を使用すると、1 本の核酸の末端にビオチンを結合した、約 3 0 0 0 塩基対を有するプローブを調整することが可能となる。

さらに、本発明に係る 2 本鎖標識体の蛍光色素としてのインターカレーター型色素についても特に制限はないが、具体的には、臭化エチジウム(ethidium bromide)、ヨウ化プロピジウム(propidium iodide)等のフェナンスリジウムインターカレーター(phenanthridinium)、アミノアクチノマイシン-D(7-AAD)、9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン(ACMA)等、またはベンゾオキサゾリウム-4-ピリジニウム(benzoxazolium-4-pyridinium,P0)、ベンゾチアゾリウム-4-ピリジニウム(benzothiazolium-4-pyridinium,B0)、ベンゾオキサゾリウム-4-キノリニウム(benzoxazorium-4-quinolinium,Y0)、およびベンゾチアゾリウム-4-キノリニウム(benzothiazolium-4-quinolinium,T0)が好ましく使用可能である。さらにこれらのダイマーであるPOP0、BOB0、YOY0、TOT0等も好ましく使用可能である。これらは、数塩基対に対して約 1 個の色素がインターカレートすることが知られており、極めて多くの数の蛍光色素で染色可能となる。

本発明において好ましく使用される前記インターカレーター型の色素は、2 本鎖にインターカレートして発蛍光性となるものであり、測定時に残留するフリーの色素からのバックグラウンドを著しく減少させることとなる。

本発明に係るプローブが有する特異的結合反応基については、使用する特異的反応に依存するが、例えば、抗原抗体反応、アビジン・ビオチン結合反応、またはレセプター・リガンド結合反応等が好ましく使用できる。

この目的で上記反応基を本発明に係るプローブに結合する方法については特に制限はなく、通常の有機合成反応を利用可能である。例えば以下に説明する実施例では、末端をビオチン化した短い核酸を出発物質としてPCRによりプローブを調整している。

(2本鎖核酸マイナーグループ結合型蛍光色素)

本発明に係る標識体の好ましい他の一形態は、図1Bで示されるように、適当な塩基配列数の2本鎖核酸であって、かつマイナーグループ結合型蛍光色素で染色される他は、基本的には上記図1Aで説明した2本鎖核酸インターカレーター型蛍光色素のものと同様の2重鎖核酸構造を有するものである。さらに特異的結合反応性基を有するものである。係る2重鎖核酸は十分な塩基数を有し、望ましい数のマイナーグループ結合型蛍光色素で染色されたものであり、特異的結合反応性基を介して標識された被検体は、十分な蛍光を発生し、蛍光顕微鏡下で1個ずつ観測可能な蛍光輝点を与えるものである。この場合上記2重鎖核酸の塩基数、塩基の種類には、特に制限はないが、好ましくは100～50000個（さらに好ましくは、100～5000個）の塩基対からなる核酸である。係る範囲の塩基数よりも少ない場合には、十分な数のマイナーグループ結合型蛍光色素で染色することができず、従って、通常の倍率（対物レンズ20～100倍）の蛍光顕微鏡下で1個ずつ観測可能なほど十分な大きさの蛍光輝点を与えることができない。また、係る範囲の塩基数よりも多い場合には、該核酸自体の安定性が十分でなく、自己分解等の問題が生じ、取扱及び保存安定性が悪くなる。通常の核酸（DNA）の場合、マイナーグループ結合型蛍光色素は、十分な数の色素が取り込まれ、従って通常の蛍光顕微鏡でも十分1個ずつ認識可能とするものである。

また、必要な長さの２本鎖核酸を調製するためには種々の公知の方法が使用可能である。例えば、化学合成に基づくもの、酵素反応に基づくもの、天然の核酸から調整する場合、もしくはPCR等により調整する方法、またはプラスミドやファージのクローニング法による場合等が好ましく使用可能である。

本発明において好ましい調製方法としては、さらに以下に説明するように、特異的結合反応性を有する基を有する必要があること、および十分な長さの核酸を効率的に調整することを同時に満たすものとしてポリメラーゼチェーン反応PCR法を用いることが好ましい。実施例に示したように、この方法を使用すると、１本の核酸の末端にビオチンを結合した、約３０００塩基対を有するプローブを調整することが可能となる。

本発明に係る２本鎖プローブは、構成する核酸の種類には特に制限はない。従って、必要な長さの２本鎖核酸を得るためには種々の公知の方法が使用可能である。例えば、化学合成に基づくもの、酵素反応に基づくもの、天然の核酸から調整する場合、もしくはPCR等により調整する方法、またはプラスミドやファージのクローニング法により調整することができる。

本発明においては、以下に説明するように、さらに特異的結合反応性を有する基を結合する必要があること、および十分な長さの核酸を効率的に調整することを同時に満たすものとしてPCR法を用いることが好ましい。実施例に示したように、この方法を使用すると、１本の核酸の末端にビオチンを結合した、約３０００塩基対を有するプローブを調整することが可能となる。

さらに、本発明に係る２本鎖標識体の蛍光色素としてのマイナーグループ結合型(minor groove-binding)色素の具体例としてはヘキスト社製のHeochst33258、33342、DAPI、及びDIP1が挙げられる。

また、特異的結合反応基についても上記インターカレータ型と同様、使用する特異的反応に依存するが、例えば、抗原抗体反応、アビジン・ビオチン結合反応、またはレセプター・リガンド結合反応等が好ましく使用できる。

この目的で上記反応基を本発明に係るプローブに結合する方法については特に制限はなく、通常の有機合成反応を利用可能である。例えば以下に説明する実施例では、末端をビオチン化した短い核酸を出発物質としてPCRによりプローブを調整している。

(1 本鎖核酸共有結合型蛍光式素)

本発明に係る標識体の好ましい他の一形態は、図1Cで示されるように、適当な塩基配列数の1本鎖核酸であって、かつ該核酸に化学結合により蛍光色素を結合することで染色するものである。係る1本鎖構造を有するものは、以下に説明する十分な数の蛍光色素でラベル化可能であれば、特に、塩基の数、塩基の種類には制限はない。

以下に説明するように、標識された被検出物の1個を検出可能とするためには、十分な数の蛍光色素でラベル化する必要があり、この目的には、核酸は長いほうが好ましい。一方、本発明にかかるプローブを通常の実験条件下、保存条件下で安定に簡便に取り扱うためには、あまりに長い核酸である場合、切断等が起こり取扱に不便となる。従って、本発明に係るプローブは100～5000個の塩基からなる1本鎖核酸であることが好ましい。さらに、好ましくは、100～5000の範囲のものである。この場合、例えば以下に説明する蛍光色素ラベル化ヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応（以下PCRと略する）で調製する場合には、核酸塩基数の約25%程度に相当する色素でラベル化され得るものであり、例えば、4000塩基長の核酸であれば、通常200～1000個程度の色素でラベル化されることとなる。この蛍光色素染色プローブで標識する場合、通常の蛍光顕微鏡でも十分1個ずつ認識可能なものとなる。

本発明に係る1本鎖プローブは、構成する核酸の種類には特に制限はない。従って、必要な長さの1本鎖核酸を得るためには種々の公知の方法が使用可能である。例えば、化学合成に基づくもの、酵素反応に基づくもの、天然の核酸から調

整する場合、もしくはPCR等により調整する方法、またはプラスミドやファージのクローニング法により調整することができる。

本発明においては、以下に説明するように、さらに特異的結合反応性を有する基を結合する必要があること、および十分な長さの核酸を効率的に調整することを同時に満たすものとして蛍光色素でラベル化したヌクレオチドを使用してPCR法を用いることが好ましい。生成物を適当な処理により1本鎖とすることも可能である。実施例に示したように、この方法を使用すると、1本の核酸の末端にビオチンを結合した、最大約2000塩基対を有するプローブを調整することが可能となる。

上記本鎖標識体の蛍光色素ラベル化反応は特に制限はなく、種々の共有結合により蛍光色素を結合したヌクレオチドを用いて、種々の公知の合成方法により、標識体に取り込ませることが可能である。例えば、モレキュラープローブ社のOligoGreen等を用いて、オリゴヌクレオチドや1本鎖DNA等に蛍光色素ラベル化することが可能である。この場合、核酸塩基数に対し相当数の色素が結合し得るものであり、この蛍光色素染色プローブで標識する場合、通常の蛍光顕微鏡でも十分1個ずつ認識可能なものとなる。

係る共有結合による染色は、通常の洗浄条件下においては、極めて安定であり、バックグラウンドを他の染色方法による場合と比較してより下げることが可能となる。

また、特異的結合反応基についても上記インターカレータ型と同様、使用する特異的反応に依存するが、例えば、抗原抗体反応、アビジン・ビオチン結合反応、またはレセプター・リガンド結合反応等が好ましく使用できる。

この目的で上記反応基を本発明に係るプローブに結合する方法については特に制限はなく、通常の有機合成反応を利用可能である。例えば以下に説明する実施例では、末端をビオチン化した短い核酸を出発物質としてPCRによりプローブを調整している。

(2本鎖核酸共有結合型蛍光色素)

さらに、本発明に係る標識体の好ましい他の一形態は、図1Dで示されるように、上記説明した1本鎖核酸共有結合型蛍光色素によるものを2重鎖を形成させたものである。従って、この場合には、上記1本鎖核酸のものに比較して2倍の色素で染色され得るものである。

高感度蛍光検出方法

本発明に係る検出方法は、上記説明した本発明に係る標識蛍光物質を用いて被検体を標識した標識体の蛍光を測定することによるものである。この場合、該標識体からの蛍光を検出する方法として、(1)全蛍光強度を集めて測定する方法と、(2)適当な固定化手段と拡大手段とを用いて、各標識体からの1個1個の蛍光を輝点として測定し計測する方法が可能である。

(1)の全蛍光強度を測定する方法は、標識体を含む溶液や、該標識体を吸着した固相（具体的には、マイクロタイタープレート、ガラススライド、メンブラン等が挙げられる）に、通常公知の蛍光測定手段を応用して測定することで可能となる。具体的には、マイクロタイタープレートリーダーが挙げられる。係る場合の検出器としては、I-CCD、SIT、PMT、APD等が挙げられる。さらに、得られた蛍光強度データは、通常公知のデータ解析方法により処理可能である。例えば、濃度の既知の標品を用いて、濃度対全蛍光強度の検量線を作成することで、濃度未知の被検体の濃度を定量することが可能となる。

一方本発明においては、(2)の方法、すなわち、該標識体を適当な固定相に固定し、さらに必要ならば適当な拡大手段を用いて、各標識体からの1個1個の蛍光を輝点として計測することが可能である。本発明に係る方法は、標識体を固定する方法には特に制限されない。蛍光輝点を計測するに要する時間間隔内でその位置を実質的に変更しない程度であればよい。具体的には、グリセリン等の粘度

の高い媒体中で測定する方法も可能である。又は適当な処理により、適当な固定相上に固定化することも可能である。本発明で好ましく使用可能な固定化用固相としては具低的には、マイクロプレート、スライドガラス、各種のメンブランが挙げられる。これらは特に、固相自体が低蛍光性又は無蛍光性のものが望ましい。本発明に係る方法は、該固定化方法には特に制限はなく、通常公知の化学的結合を使用する方法、または蛋白質－蛋白質間の特異的結合反応等を用いることが可能である。

化学結合を用いる方法としては、固相上に適当な処理により反応性基（水酸基導入等）を導入し、さらに該基に被検体と特異的に反応する結合基を導入することで調整可能である。必要ならば、適当なリンカー部を介することも可能である。また、蛋白質－蛋白質間の特異的結合反応等を用いる方法としては、通常のイムノアッセイで知られている種々の方法が制限なく使用可能である。

本発明に係る方法によれば、上記固定相上に固定化された被検体からの蛍光は通常の拡大手段を用いることで蛍光輝点として計測可能である。係る拡大手段としては、マイクロプレートリーダ、蛍光顕微鏡、走査型蛍光顕微鏡等が挙げられる。

得られる蛍光輝点の集合としての測定データ（画像）から、蛍光輝点データは、目視でも、または適当な検出器で高感度で検出することが可能である。高感度で検出するためには、具体的には I - C C D、S I T、P M T 又は S P D 等が好ましく使用可能である。

本発明に係る高感度蛍光検出用標識体により標識された被検出物は、十分な数の蛍光色素で染色されているため、通常の蛍光顕微鏡下において検出可能となる。実際本発明に係る 1 0 0 0 塩基以上の長さの核酸であれば、蛍光色素が約 2 5 0 個程度インターカレーターしており、染色されたプローブは通常の蛍光顕微鏡下において、点もしくは線状の蛍光体として検出可能である。すなわち、本発明に係るプローブで標識された被検出物の 1 個 1 個が輝点として検出可能となり、係

る輝点の数を計測することにより、標識された一個一個の被検出物の超高感度測定方法に使用可能となる。

本発明に係る高感度蛍光検出方法で使用する蛍光顕微鏡装置については特に制限はなく通常の対物レンズ倍率20x～100xを備える装置であれば好ましく使用可能である。具体的には、倍率40x程度であり、かつ輝点計測のための画像処理装置を有するものであればよい。

得られた蛍光輝点に基づくデータは、種々の目的に応じて、0次元蛍光強度解析システム、または画像解析システム（パーティクルカウンティング）により処理が可能である。具体的には、バックグラウンド測定することにより、非特異吸着の程度が、非時的吸着した標識対に基づく輝点数として得られ、係るバックグラウンド輝点数を統計処理することにより、実際の標識体からの蛍光輝点計測データの有意性の判別に使用可能となる。

図2及び図3に、本発明に係る高感度蛍光検出の好ましい一態様例を示したように、適当な固定相（ここではマイクロタイタープレートのウェルを模式的に示す）に、リンカーを介して特異的結合基（ここではビオチンとして示される）を固定した処理が施された固定相上に、被検体（ここではアビジン）に対し特異的結合基により結合した本発明に係る高感度蛍光検出用標識体（ここでは核酸2重鎖の場合を示す）を、適当な倍率の蛍光顕微鏡（ここでは落射蛍光顕微鏡の使用を模式的に示した）を用いて蛍光測定（又は蛍光輝点を計数し）計測し、所定の面積内の蛍光輝点を計測するものである。

図4に典型例として、スライドガラス上に固定された標識体の蛍光輝点を示した。図4から明らかなように、蛍光輝点の一定面積内での数は、適当な濃度では目視による計数でも可能である。より正確に計数するためには、得られた蛍光輝点の画像を処理することで可能となる。具体的には、各輝点の位置及びその強度についてのデータに基づき、バックグラウンド補正、各輝点の重なり（蛍光顕微鏡の分解能、及び倍率等に基づく）の補正等である。バックグラウンド補正につ

いては、輝点以外の部分からの蛍光強度を平均等して統計処理し、バックグラウンド蛍光強度、または輝点数として補正することが可能である。補計測されている2以上の輝点を2点として判断することも可能である。さらに、各輝点の重なりについても、適当な画像処理により、それぞれを分離し、補正することも可能である。

以上の蛍光輝点計数に基づき、蛍光輝点の数が決定される。得られる数に基づき、標識体の数又はその基づく濃度の決定が可能となる。さらに、被検体の分子数、さらに、その値に基づき被検体の初期の濃度の定量が可能となる。具体的には、被検体の既知濃度と、所定の希釈後の被検体を本発明に係る高感度蛍光検出用標識体で標識して計測した輝点の数とから検量線を作成し、この検量線に基づき、未知の被検体の存在の判断又は濃度の定量が可能となる。

以下実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限定されるものではない。

(実施例1)

ラムダファージのDNA（長さ48.5kbp、16 μ m）、プラスミドのPCR産物（長さ4kbp）、プラスミドのPCR産物（長さ1kbp）をY0Y0-1（モレキュラープローブ社）を用いて蛍光染色し、グリセリン50%溶液に希釈懸濁して無蛍光性のスライドガラス及びカバーガラス間に封入して、蛍光顕微鏡（Zeiss社AXIOBART、40倍対物レンズ及びB-励起用ダイクロイックミラーユニット装置）を用いてカバーガラス側から観測した。

図4に示されるように、輝点もしくは輝線状の蛍光体として1つ1つを区別して観測されることがわかった。

(実施例2)

マイクロタイタープレートを用いて、固相表面上に固定された被検物質の定量を行った。本実施例と同様の方法で、被検物質としては、任意の抗原、任意のリガンド、特定の標識体（ビオチン、ジニトロフェノール等）でラベル化された被

検出物質等を使用することが可能である。

ラベル体として用いられるビオチンを固相表面上に固定して、そのビオチンを特異的結合反応をするタンパクであるアビジンを用いて検出した（図2 および図3に模式的に示される）。

ビオチンの固定化には、アミノ酸を有するリンカーが内壁に固定されている市販のマイクロタイタープレート(Nunc社のCovaLink)を用いた。リンカーのアミノ基にビオチンを固定するには、ビオチン化試薬であるN-ヒドロキシサクシニミドビオチン(NHS-ビオチン)を用いてリンカーのアミノ基をビオチン化した。アビジン1分子は、ビオチン4分子に結合することができる。従って、固相表面上のビオチンと特異的に結合したアビジンには、更に、ビオチン化核酸を結合させることができる。

標識体としての核酸は、プラスミドpBluescript II KS+の一部をPCR増幅したものをを用いた。100塩基長、及び500塩基長のものは共通無修飾プライマー(5'-ATACGTCGACCTCGAGG-3')と、それぞれ100塩基用ビオチンプライマー(5'-ビオチン化-TCACACACAGGAAACAGCTA-3')、500塩基用ビオチン化プライマー(5'-ビオチン化-CGTCGATTTTTGTGATGC-3')を用いた。3000塩基長のものは3000塩基用ビオチン化プライマー(5'-TCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTAGC-3')と3000塩基用無修飾プライマー(5'-GAACAAAGAAACCACCAGAAGGAGCGGAAT-3')を用いることにより、プラスミド上の上記それぞれのプライマーと相補的な配列を有する区間(約3000塩基)をPCR増幅により作製した。PCR増幅された核酸の長さはアガロース電気泳動で確認した。得られたビオチン化核酸は、予めインターカレーター型等の蛍光色素であるYOYO-1と混合することにより染色しておいた。

固相表面上のビオチンとアビジンを介して特異的に結合した蛍光標識ビオチン化核酸は、未反応のアビジンや標識核酸を洗浄除去後、リン酸緩衝液で満たしたマイクロタイタープレートの各ウェルを下から、倒立型落射蛍光顕微鏡にテレビ画像処理装置を備えたものをを用いて計測した。テレビカメラはSITを用いた。B-

励起用ダイクロイックミラーユニット（450nm～490nm励起；FT510nm；蛍光フィルター545～565nm）及び40倍対物レンズを用いて各ウェルの底面内壁に焦点を合せて2秒間の蓄積蛍光像を撮った。蓄積蛍光像の中心付近の100 μ m \times 100 μ mの領域の蛍光強度を計測した。リン酸緩衝液のみの蛍光強度をコントロールとした。

得られた顕微鏡蛍光像は固相表面上をビオチン化したときに用いたNHS-ビオチンの濃度に応じて暗くなった。すなわち、3000塩基長の場合は、低濃度のときは標識核酸は蛍光輝点として識別可能であることを示している。

上記得られた蛍光輝点の全強度を総和して、固相表面上をビオチン化したときに用いたNHS-ビオチンの濃度に対しプロットしたところ、アビジンの非特異的な吸着による蛍光強度に達するまで希釈していった薄いNHS-ビオチンの濃度を濃度依存的に検出することができた（図5）。ここで比較として用いたビオチンの濃度検出に酵素標識法を用いた場合には、本発明に係る核酸のうち100塩基長相当程度に検出されている。従って、本発明に係る方法において蛍光強度の定量においては少なくとも酵素標識法と同等の感度を示すことがわかる。また、蛍光定量であれば市販のマイクロプレートリーダー等の装置を用いることも可能である。

上記記載の方法と同様にして、ビオチンの濃度、ビオチンの吸着量だけでなく、抗原、抗体、リセプター、リガンド等の濃度や吸着量も計測可能である。例えば、抗体を標識するためには、ビオチン化した抗体を用いて、アビジンを介して上記のビオチン化蛍光標識核酸で標識してもよいし、末端に官能基を導入した標識核酸を用いて直接抗体の側鎖官能基と共有結合させてもよい。また、標識用核酸に蛍光性をもたせるためには、蛍光性のヌクレオチドを用いてPCR法等で酵素的に核酸を複製増幅するときに取り込ませてもよい。

（実施例3）

さらに、標識用核酸に蛍光ラベルを導入する他の方法として、蛍光色素ラベル化オリゴヌクレオチドを用いてPCR増幅により標識核酸を合成した。さらに、

該方法により合成した核酸分子の1本1本が蛍光顕微鏡で観察可能であることを示す実験を行った。蛍光色素ラベル化オリゴヌクレオチドとして、フルオレセイン-dUTP（アマーシャム社のフルオログリーン）、標識用核酸の合成にはタカラ社製LA-PCRキットを用いた。標識核酸のテンプレートとして、 λ DNA、プライマーとして5'-ATCATTTATTTGATTTCAATTTTG TCCCACTCCC-3' および5'-AGGTCGCCGCCCGTAA CCTGTCGGATCACCGGAAA-3' を用いて λ DNAの一部（20707bp）を増幅した。増幅された蛍光性標識核酸はマイクロコンで余分なフルオレセイン-dUTPから分離して50%グリセロール溶液に希釈懸濁して実施例1と同様にして蛍光顕微鏡で観察した（図6）。YOYO-1で染色した核酸よりもすこし蛍光強度が小さい傾向であるが、 λ DNAの一部（20707bp）は分子1本1本が傾向顕微鏡で観察可能であることがわかる。

（実施例4）抗原抗体反応の検出

スライドガラス上に吸着させたプロスタグランジンE₂と、BSAの結合体（PGE₂-BSA）を抗PGE₂抗体と反応させて、アビジンおよびYOYO-1染色したビオチン化 λ DNAを結合させて蛍光顕微鏡観察を行った。

スライドガラスはSigma社のSilane coating slideを使用した。希釈用リン酸緩衝液（PBS）は、pH7に、洗浄用リン酸緩衝液（PBS）は、pH7.5に調製した。

スライドガラス上にPGE₂-BSAを吸着させるには、各濃度（0.84mg/ml、0.164mg/ml、0mg/ml）となるようにPGE₂-BSAをPBS（pH7）に溶解して得た溶液の30 μ lをスライドガラス上に滴下しカバーガラスとゴム製のスパーサーで封入して、室温で1.5時間インキュベートしてから、300 μ lのPBSで3回洗浄した。その後に、抗体の非特異的吸着サイトを極力減らすために、ブロッキング緩衝液（BSA1.68mg/ml-ペーリンガー社のPGE₂-ELISAキット：カタログ番号1469231）30 μ lを滴下し、

室温で1時間インキュベートした。核酸とカップリングするために、更に、アビジン（ベーリンガー社のPGE2-ELISAキット）30 μ lを滴下し、室温で1.5時間インキュベートした後に、3回洗浄した。蛍光標識核酸としてPCR産物80 μ lに1mM-YOYO1を1 μ l加えて純水で4mlとしたものを用いた。これを、30 μ lを滴下し、室温で1時間インキュベートした後に、300 μ lのPBSで3回洗浄した。最後に、30 μ l以上のPBSを滴下し気泡を完全に除いてからカバーガラスとゴム製のスぺーサーで封入した。標識用核酸のPCR増幅は以下のPCRミックスを、変性94 $^{\circ}$ C（20秒）、アニーリングおよび伸張反応68 $^{\circ}$ C（15分）を30回繰返しサイクルで行った。

10xPCRbuffer	5 μ l
(LA-PCRキットRR013A、TAKARA)	
テンプレート（同上のキット）	2 μ l
プライマーL1（同上のキット）	2 μ l
プライマーL2（同上のキット）	2 μ l
4dNTP（同上のキット）	8 μ l
LA Taq DNAポリメラーゼ（同上のキット）	0.5 μ l

得られたサンプルは、溶液の状態でマイクロタイタープレートの実験同様に蛍光顕微鏡観察を行った。蛍光顕微鏡は、ZeissAxiovert135TV、対物レンズ40x、検出装置は、ARGUS50SITカメラシステムを用いた。抗体に結合したYOYO-1染色DNAの像を図7A～図7Cに示す。ここで、吸着反応時のPGE2-BSAの濃度は、図7A～Cのそれぞれの条件で、0.84mg/ml、0.164mg/ml、0.0mg/mlとした。得られた画像の画像処理は、ARGUSシステムの画像処理のパーティクルカウンティングによりPGE2-BSA溶液の濃度に応じた蛍光輝点数が得られ、コントロールの0.0m

g/mlPGE2-BSAと有意の差のあることが示された。

図8には、上記画像処理から得られた、蛍光輝点数をPGE2-BSA濃度に対しプロットしたものであり、良好な直線性を示すことが示された。なお、本実施例では、非特異吸着として2個計数されたが、この結果は、本発明に係る方法を使用することで、非特異的吸着の程度を高感度に定量可能となることが示された。

産業上の利用性

本発明に係る高感度蛍光イムノアッセイは、十分な数の蛍光色素で染色された核酸を有し、さらに標識するために特異的結合反応を利用するための結合基を有する標識体によるものであり、従って、この標識体で標識された物質を通常の蛍光顕微鏡で1個1個を観測可能とし、超微量生体機能物質等を高感度で迅速かつ簡便に蛍光検出することが可能となる。酵素標識法と同等もしくはそれ以上の感度を有し、しかも標識体として核酸を用いるために酵素に比較して安定で保存性に優れ、かつ検出するときに酵素標識法と異なり酵素反応の必要がなく迅速に定量可能とするものである。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

ATA CCG TCG ACC TCG AGG 18

配列番号：2

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TCA CAC AGG AAA CAG CTA 18

配列番号：3

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

CGT CGA TTT TTG TGA TGC 18

配列番号：4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT AGC 30

配列番号：5

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GAA CAA AGA AAC CAC CAG AAG GAG CGG AAT 30

配列番号：6

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

ATC ATT ATT TGA TTT CAA TTT TGT CCC ACT CCC 33

配列番号：7

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AGG TCG CCG CCC CGT AAC CTG TCG GAT CAC CGG AAA 36

配列番号：8

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT AGC 30

配列番号：9

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GAA CAA AGA AAC CAC CAG AAG GAG CGG AAT 30

請求の範囲

1. 蛍光色素により染色した核酸部分と、被検体に特異的に結合する特異的結合反応基とを有する標識蛍光物質を用いて前記被検体を標識する工程と、前記標識蛍光物質の蛍光を検出する工程を有することを特徴とする蛍光イムノアッセイ。
2. 前記標識された被検体を固相上に固定する工程をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイ。
3. 前記蛍光を検出する工程が、さらに光学的拡大手段を用いることを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイ。
4. 前記光学的拡大手段が蛍光顕微鏡であることを特徴とする請求項3に記載の蛍光イムノアッセイ。
5. 前記標識蛍光物質の蛍光を、蛍光輝点数として計数することを特徴とする請求項3に記載の蛍光イムノアッセイ。
6. 前記核酸部分が塩基数100～50000を有する2本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が、前記塩基数に対し10～25%の数のインターカレーター型蛍光色素によることを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイ。
7. 前記核酸部分が塩基数1000～5000を有する2本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が、100～1200の数のインターカレーター型蛍光色素によることを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイ。
8. 前記核酸部分が塩基数100～50000を有する2本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が、前記塩基数に対し10～25%の数のマイナーグループ型蛍光色素によることを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイ。
9. 前記核酸部分が塩基数100～50000を有する1本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が、前記塩基数に対し10～70%の数の蛍光色素を前記核酸に共有結合したことを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイ。

10. 前記核酸部分が塩基数100～50000を有する2本鎖核酸であり、かつ前記蛍光色素による染色が前記塩基数に対し10～70%の数の蛍光色素の前記2本鎖核酸に共有結合したものであることを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイ。

11. 前記特異的結合反応基が、前記核酸の末端部に結合したビオチンであることを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイ。

12. 前記蛍光顕微鏡の倍率が500倍以下であることを特徴とする請求項1に記載の蛍光イムノアッセイ。

図 1A

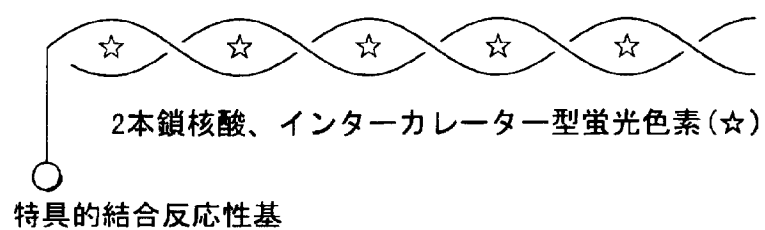


図 1B



図 1C

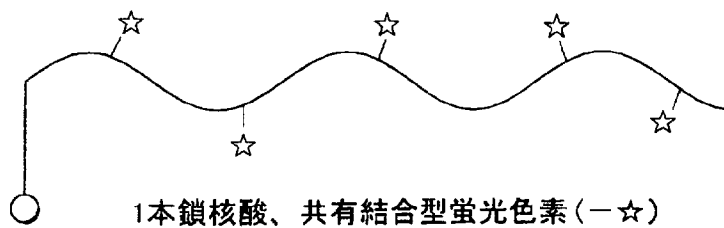


図 1D

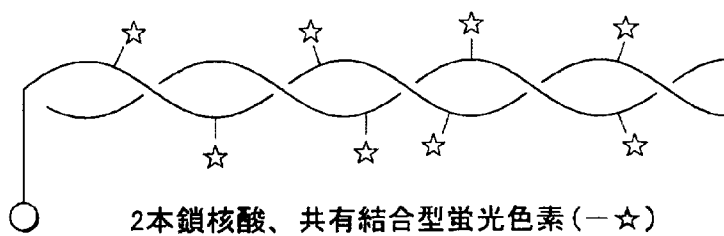


図2

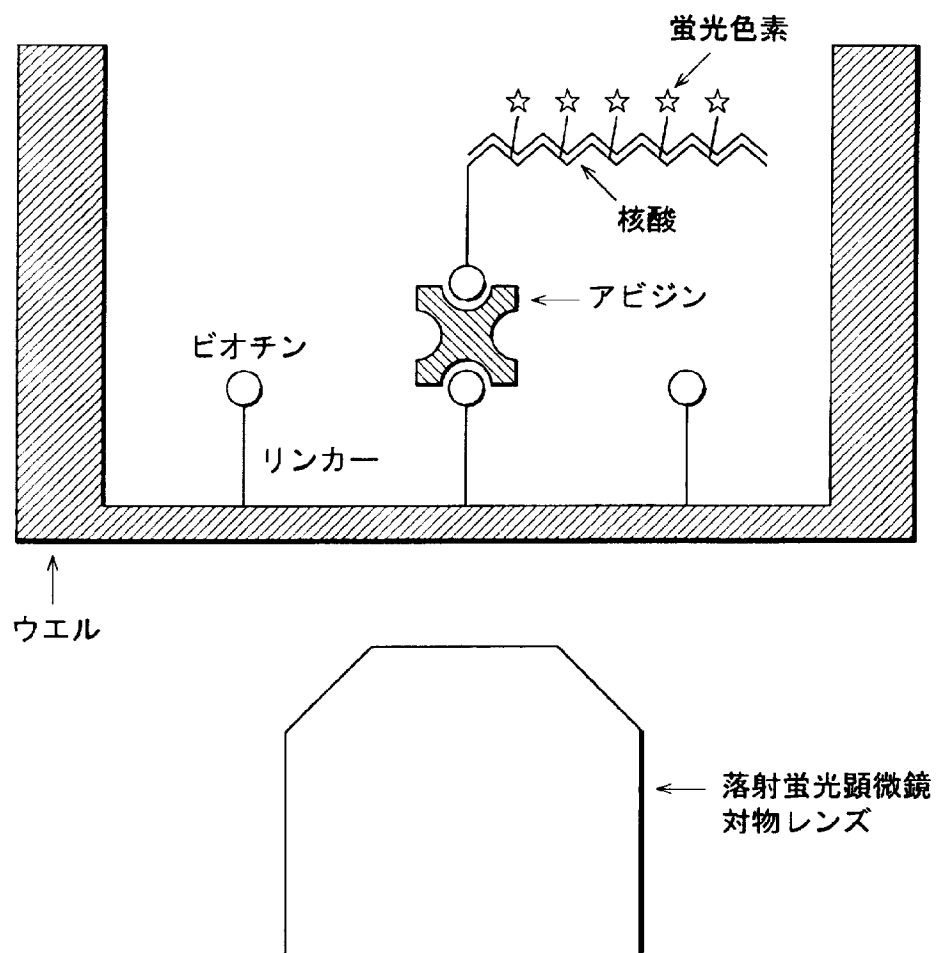


図3

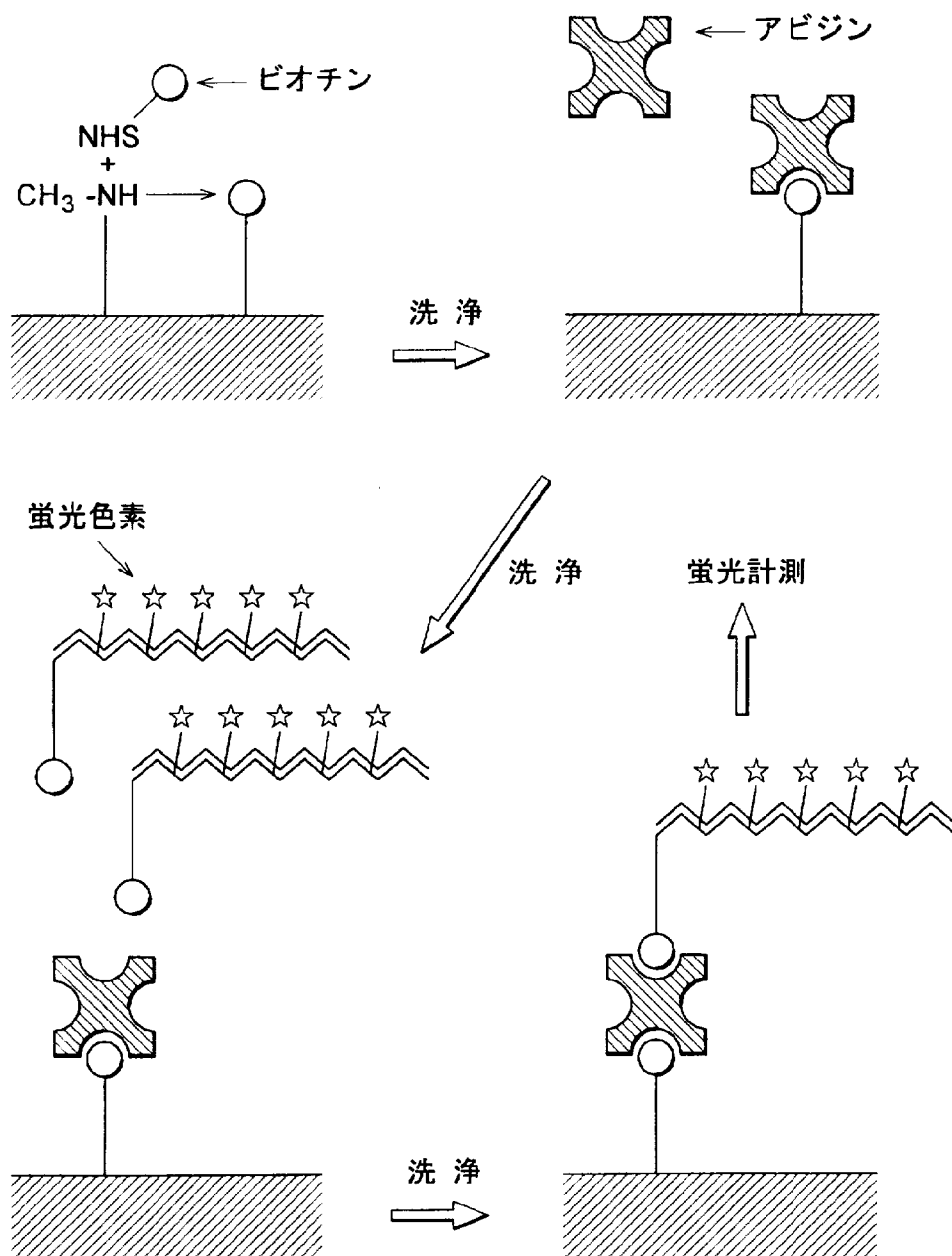


図 4

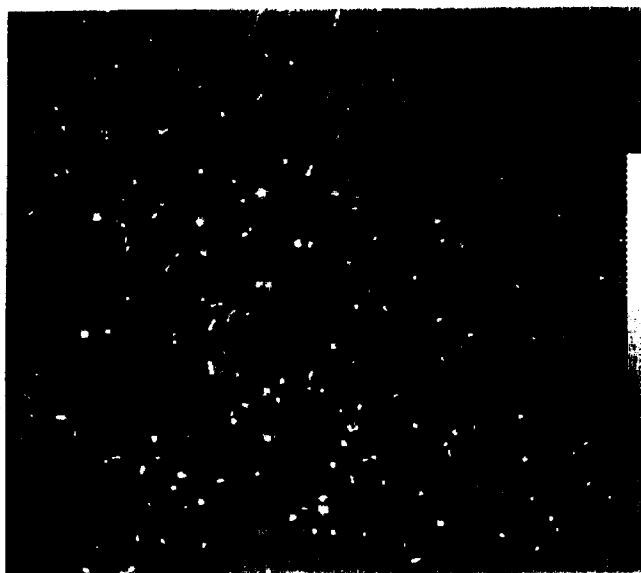


FIG. 4

50 μ m

図5

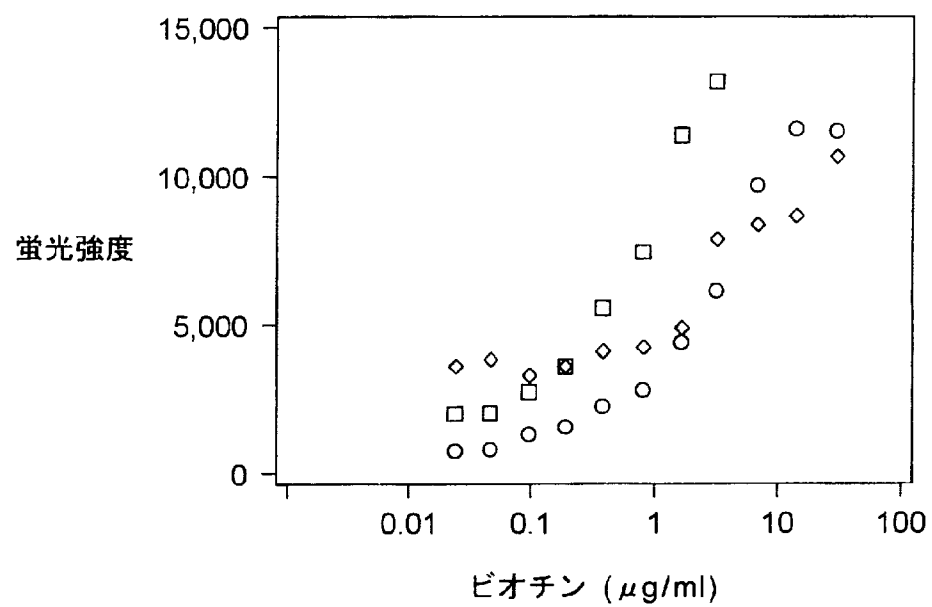
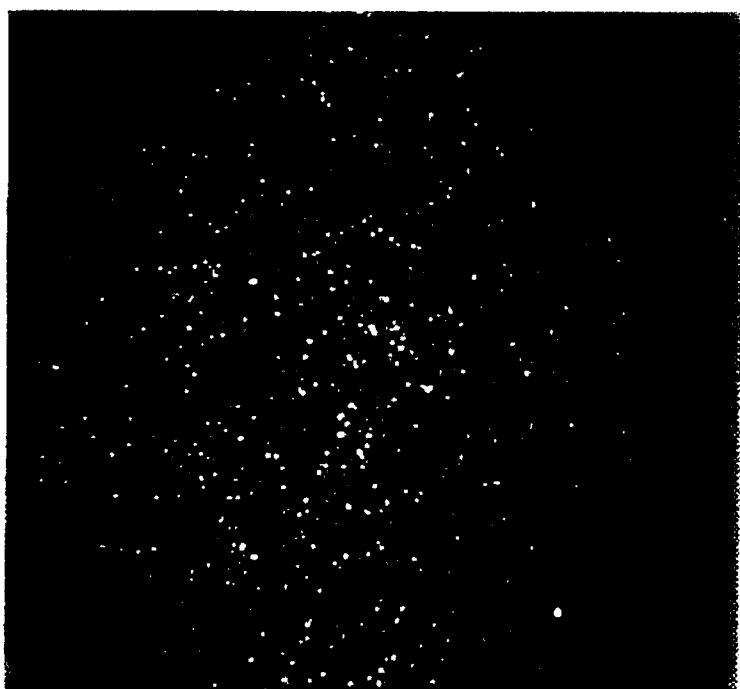


図 6



50 μ m

図 7A

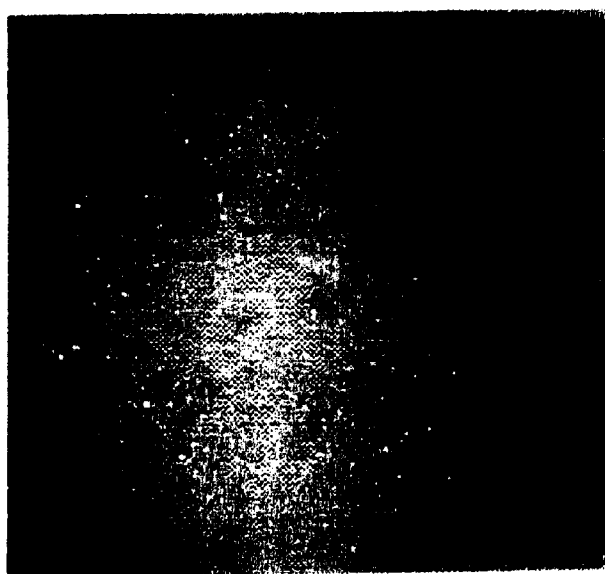


Figure 7A

30 μ m

図 7B



50 μm

50 μm

 7C

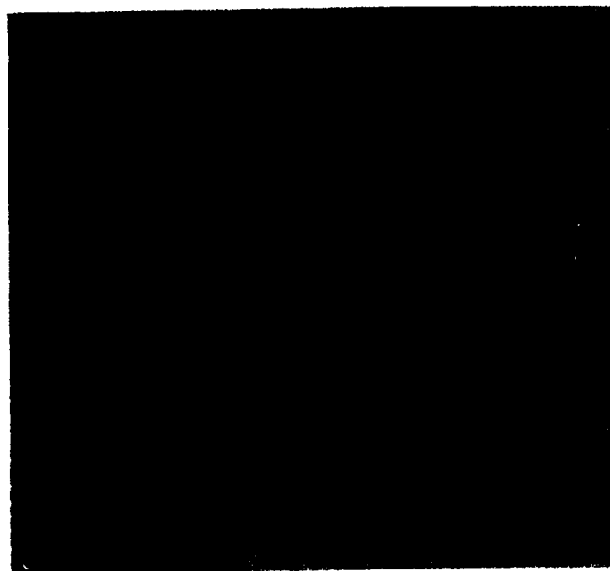
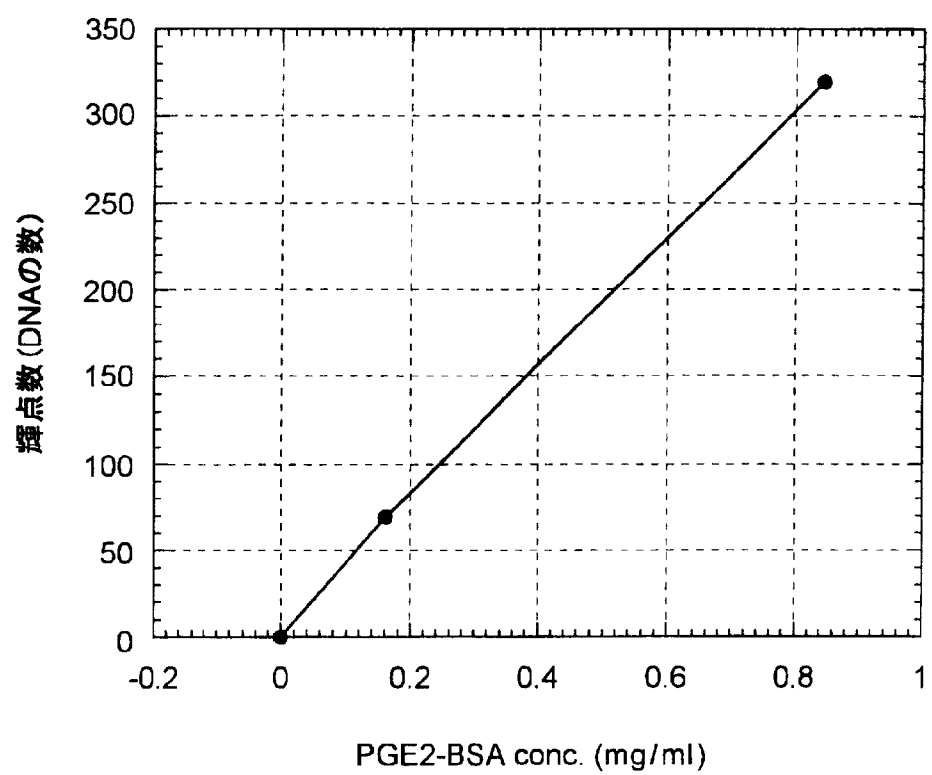


FIG. 7C

50 μ m

図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01960

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ G01N33/533, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ G01N33/533, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1940 - 1997
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1997
Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994 - 1997

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 60-226900, A (Molecular Diagnostics, Inc.), November 12, 1985 (12. 11. 85) & EP, 154884, A	1 - 12
A	JP, 7-265076, A (Nikon Corp.), October 17, 1995 (17. 10. 95) (Family: none)	1 - 12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
August 4, 1997 (04. 08. 97)

Date of mailing of the international search report
August 19, 1997 (19. 08. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/533, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/533, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1997年
 日本国公開実用新案公報 1971-1997年
 日本国登録実用新案公報 1994-1997年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 60-226900, A (モレキュラー・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド), 12. 11月. 1985 (12. 11. 85) & EP, 154884, A	1-12
A	J P, 7-265076, A (株式会社ニコン), 17. 10月. 1995 (17. 10. 95) (ファミリーなし)	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 08. 97

国際調査報告の発送日

19.08.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

印

2 J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3252